Raport stiintific

privind implementarea proiectului in perioada mai – decembrie 2013

In cadrul etapei I a proiectului cu titlul „A new anti-invasive experimental strategy for infiltrative malignant gliomas", cod proiect PN-II-RU-TE-2012-3-0235, au fost indeplinite urmatoarele obiective propuse in planul de realizare al proiectului:

1. Evaluarea expresiei genelor implicate in invazia glioamelor in probele de glioblastom si in culturile primare de glioblastom, prin analiza qPCR

2. Evaluarea expresiei genelor implicate in invazia glioamelor in liniile de glioblastom prin analiza qPCR

3. Dezvoltarea unui nou model experimental de invazie in glioblastom

In vederea realizarii acestor obiective s-au desfasurat urmatoarele activitati:

A. Recoltarea probelor de glioblastom prin procedura chirurgicala clasica, "open surgery" (Activ. 1.1) si procedura biopsiei stereotactice (Activ. 3.1)

B. Obtinerea culturilor primare de glioblastom si achizitionarea liniilor de glioblastom (Activ.1.2 si Activ.2.1)

C. Analiza qPCR a genelor implicate in invazia glioamelor (Activ. 1.4 si Activ. 2.3)

D. Prelucrarea probelor tisulare extrase, cultivarea lor si evaluarea viabilitatii lor in cultura (Activ. 3.2)

A. Recoltarea probelor tumorale

Recoltarea probelor de glioblastom utilizate in proiect s-au realizat fie prin procedura clasica neurochirurgicala ("open surgery") fie prin procedura biopsiei stereotactice. S-au obtinut fragmente tumorale extrase conform protocolului standard chirurgical, proba tumorala fiind selectata din cadrul fragmentelor destinate analizei anatomo-patologice. Astfel prelevarea probelor tumorale incluse in prezentul studiu nu a influentat in niciun fel tehnica chirurgicala sau gradul rezectiei in cazul tehnicii "open surgery", respectiv nu a prelungit timpul de desfasurare al procedurii bioptice stereotactice. Recoltarea probelor s-a facut in conditii de deplina siguranta pentru pacient si s-a efectuat cu consimtamantul scris al pacientului si al apartinatorilor (Fig.1).

SPITALUL CLINIC DE URGENTA BAGDASAR-ARSENI
Sos.Berceni, nr.12, sector 4, cod 041915
tel.: 334.30.54 centrala:334.30.25-27 fax: 334.73.50
e-mail: directie@bagdasar-arseni.ro, rsn@bagdasar-arseni.ro

Consimţământ informat pentru inrolarea in studiul:
„A new anti-invasive experimental strategy for infiltrative malignant gliomas"

Stimata doamna/Stimate domn,

Sunteţi invitat(ă) să participaţi într-un studiu despre modificările genetice în tumorile cerebrale. Scopul studiului nostru este de a identifica mecanismele moleculare implicate in invazia glioamelor cerebrale, pentru imbunatatirea diagnosticului si terapiei.
Participarea dumneavoastra este voluntara.

PROCEDURĂ: Veţi fi rugat(ă) să oferiţi o probă de tesut tumoral in timpul operatiei.

In timpul operatiei, o mica portiune din tesutul operat va fi prelevat in vederea extractiei de acizi nucleici si proteine pentru identificarea unor markeri specifici tumorilor cerebrale.

Dorim ca după încheierea studiului de faţă să păstrăm eventualul rest din proba ADN/ARN/proteica obţinută. Aceasta va fi congelată şi depozitată sub un cod şi nu direct cu numele dumneavoastră.

În cazul în care doriţi, vă puteţi retrage oricând din studiu, fără ca aceasta să afecteze în vreun fel dreptul dumneavoastră la tratament, inclusiv după ce aţi semnat acest formular.

Rezultatele studiului pe proba dumneavoastră sunt confidenţiale şi vor fi folosite numai în scop de cercetare.

BENEFICII ale participării:
- Ajuta la imbunatatirea protocolului de diagnostic
- Ajuta la dezvoltarea de noi terapii

RISCURI:
- Nu sunt riscuri suplimentare fata de cele asumate in consimtamantul operator

PLĂŢI ŞI ALTE BENEFICII:
- Nu veţi beneficia terapeutic din acest studiu, deoarece în acesta nu se administrează niciun medicament
- Nu veţi fi plătit(ă) ca să participaţi la acest studiu

CONFIDENŢIALITATE ŞI STATUT

Doar cercetătorii implicati in proiect şi un reprezentant al Comitetului de Etică al Spitalului vor avea acces la datele adunate pe parcursul acestui studiu. Utilizarea unor informaţii de tip personal este securizată conform legislaţiei în vigoare.

Deoarece informaţiile despre dumneavoastră şi despre starea dumneavoastră de sănătate sunt personale şi private, ele nu pot fi folosite în scop de cercetare fără acordul scris al dumneavoastră. Semnând acest formular, ne veţi da acordul dumneavoastră în acest sens.

Acest formular are scopul de a vă informa asupra felului în care datele despre sănătatea dumneavoastră vor fi folosite în acest studiu. Vă rugăm să citiţi cu atenţie înainte să semnaţi.

DATE DE CONTACT

Dacă aveţi întrebări legate de studiu sau dacă apar probleme, puteţi contacta persoana responsabila de studiu:

Dr. Felix Mircea Brehar, Spitalul Clinic de Urgenta „Bagdasar-Arseni", cu sediul în Bucuresti, cod poştal 041915, str. Soseaua Berceni nr. 10-12, judeţ (sector) 4, tel. 0213343025/int. 1707, mobil: 0724257549, fax 0213347350.

2

Declaraţia pacientului

(Incercuiti raspunsul corect)

Sunt / nu sunt de acord ca probele mele biologice să fie folosite in cercetări ulterioare

Sunt / Nu sunt de acord cu testul/testele descrise în acest formular.

- Sunt de acord ca probele sa fi depozitate în Laboratorul de Cercetare al spitalului pentru uz ulterior.
- Înţeleg faptul că proba ar putea fi trimisă spre un alt laborator în afara Spitalului Clinic de Urgenta „Bagdasar-Arseni".

Semnătura pacientului .... Data...............................

Nume (Litere de tipar) ....CNP...............................

Semnătură apartinator ruda gradul I.. Dată ....

Nume (Litere de tipar) ....

Note importante: (bifaţi dacă este cazul)

- **Pacientul şi-a retras consimţământul (rugaţi pacientul să semneze aici) ....**
Data:.......................

Declaraţia personalului medical

Am explicat procedura pacientului. În mod particular i-am explicat beneficiile şi riscurile aşa cum apar în acest formular.
Am discutat de asemenea ce ar putea implica procedura, beneficiile şi riscurile oricărei testări alternative (inclusiv lipsa unei testări) şi orice problemă care preocupă pacientul.

Semnătura:.. Data ....

Nume (Litere de tipar) ....

Statut (investigator / medic curant) ....

Fig. 1 - Modelul consimtamantului scris completat de pacientii si apartinatorii implicati in prezentul studiu

Au fost inclusi in prezentul studiu pacienti cu glioame cerebrale gradul II, III si IV (glioblastom) confirmate la examinarea histo-patologica standard (probe parafinate colorate cu hematoxilin eozin) ± examinare imunohistochimica. Motivul pentru care glioamele cerebrale grad I nu au fost incluse in studiu este faptul ca acest tip de tumori au anumite particularitati histo-patologice distincte fata de celelalte grade (cum ar fi astrocitomul pilocitic) si in plus sunt bine circumscrise si nu au tendinta la invazie (1, 2).

a. Recoltarea probelor prin tehnica neurochirurgicala clasica "open surgery"

Tehnica neurochirurgicala de exereza a tumorii a fost selectata pentru tumorile bine delimitate, localizate in zone cerebrale neelocvente, accesibile chirurgical si cu un efect de masa important asupra structurilor cerebrale (Fig. 2), la care pe primul plan era reducerea efectului de masa si la care se putea anticipa o rezectie tumorala cat mai larga fara risc major de aparitie a deficitelor neurologice postoperatorii.

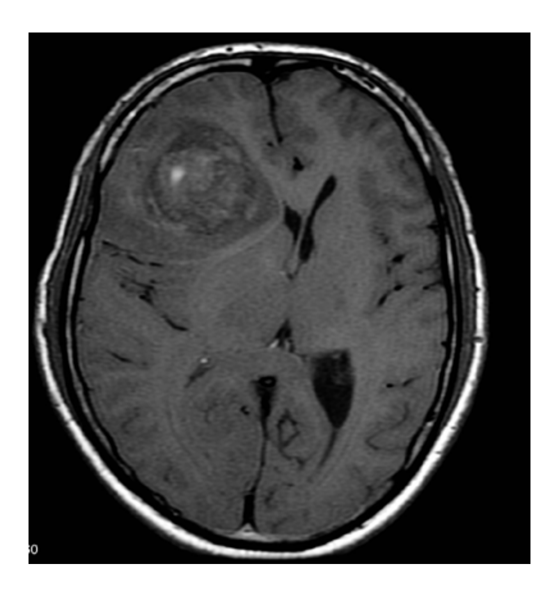


Fig.2. Glioblastom frontal drept (gliom grad IV). Tumora relativ bine delimitata, localizata frontal dreapta (emisfer cerebral non-dominant) cu efect de masa. Pacient cu indicatie de "open surgery"

Etapele operatorii sunt urmatoarele:

- anestezierea pacientului (anestezie generala cu intubatie oro-traheala)

- pozitionarea si pregatirea campului operator (Fig. 3a)

- craniotomia

- deschiderea durei mater si expunerea ariei cerebrale infiltrate tumoral care apare edematiata, cu desen vascular modificat (Fig. 3b)

- exereza tumorala

- hemostaza

- inchiderea planurilor

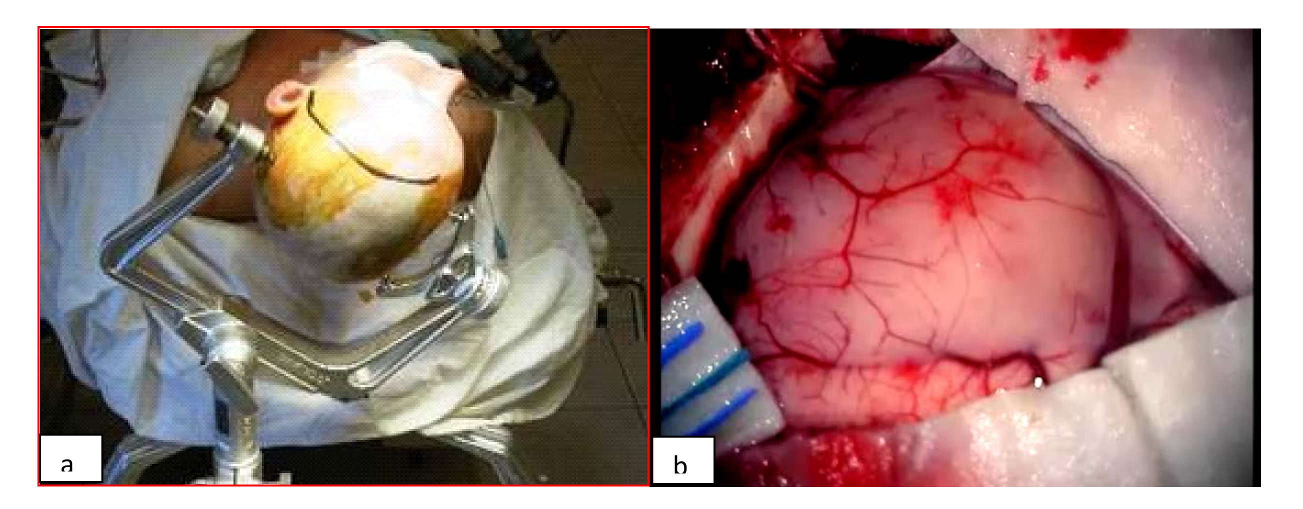


Fig. 3. Etapele operatorii ale interventiei neurochirurgicale "open surgery"- Sp. Cl "Bagdasar-Arseni"

b. Recoltarea probelor prin tehnica biopsiei stereotactice

Pacientii selectati pentru biopsia stereotactica au prezentat glioame cerebrale infiltrative (Fig. 4a), localizate profund sau in arii elocvente (Fig. 4b), la care nu se putea realiza o exereza tumorala semnificativa sau la care exereza tumorala ar fi fost insotita de un risc major de deficit neurologic postoperator.

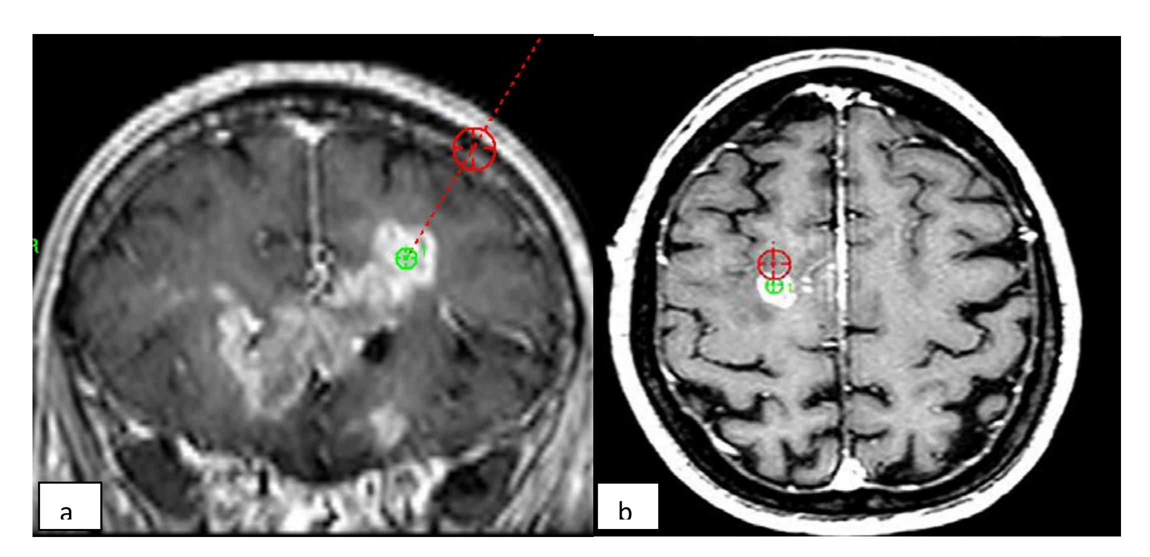


Fig.4. Tipuri de glioame cerebrale selectate pentru procedura de biopsie stereotactica (Imagini RMN cerebral secventa T1 cu contrast tip snapshot selectate in timpul planningului preoperator) - Sp. Cl "Bagdasar-Arseni"

Toate procedurile stereotactice au fost realizate de catre Dr. Felix Brehar, utilizandu-se sistemul Leksell stereotactic system (Fig.5) si softul Stereotactic Planning System (SPS) software, versiunea NTPS 8.2 (Elekta, Suedia). Pentru scanarea pacientului s-a utilizat RMN tip 1,5 Tesla Magnetic Resonance (MRI) (Philips Integra). Sistemul utilizat de autor pentru realizarea procedurii este unul dintre cele mai exacte (eroare medie sub 0,5 mm si maxima sub 1 mm). Acul de biopsie utilizat a fost Sedan type I (Elekta, Suedia) cu o fanta de sectiune de 10 mm. Etapele biopsiei stereotactice sunt:

- fixarea cadrului stereotactic

- scanarea CT sau RMN cerebral

- planningul procedurii

- biopsia stereotactica (Fig. 6)



Fig. 5. Sistemul stereotactic Leksell



Fig. 6. Aspect intraoperator al unei proceduri bioptice cerebrale stereotactice - Sp. Cl "Bagdasar-Arseni"

Probele tumorale selectate intraoperator pentru a fi incluse in studiu, au avut dimensiuni de sub 1 cm, au fost curatate de sange si detritusuri celulare si au fost incluse in contitii sterile intr-un tub ependorf de 1,5 ml umplut cu solutie RNA saver si au fost imediat pastrate la 2-4 grade C 24 ore si apoi la -80 grade pana la extractia ARN.

Pana la momentul raportarii au fost inclusi in studiu 30 de pacienti cu glioame cerebrale din care la 15 pacienti s-au recoltat probe tumorale prin tehnica chirurgicala standard tip "open surgery" si la 15 s-a practicat biopsia stereotactica. La 11 pacienti la care tumora era localizata in arii neelocvente la nivelul polului frontal si temporal s-a realizat procedura standard de rezectie de pol frontal respectiv pol temporal. In aceste cazuri s-a realizat o ablatie tumorala totala si s-a reusit prelevarea de fragmente tisulare din tesutul cerebral peritumoral in conditii de siguranta pentru pacient. Aceste probe au fost utilizate ca probe martor. A fost realizata extractia ARN la 21 de cazuri din cele 30, in total fiind luate in lucru pana la momentul raportarii 31 de probe (21 probe tumorale si 10 probe peritumorale).

B. Obtinerea culturilor primare de glioblastom si achizitionarea liniilor de glioblastom

In doua cazuri de pacienti cu tumori voluminoase (Pacientul 15 si pacientul 16) la care s-a practicat interventia neurochirurgicala deschisa s-au putut preleva mai multe fragmente tumorale din care s-au initiat culturi primare de glioblastom.

Deosebit de important este timpul de mentinere a fragmentelor in ser fiziologic sau mediu de cultura, pana la prelucrare. Prelucrarea fragmentelor tumorale se face in aceeasi zi, la cel mult 2-3 ore de la prelevarea intraoperatorie. Daca tipul de prezervare a fragmentelor de tesut tumoral depaseste cateva ore, este de asteptat ca intratumoral sa se induca si sa se intretina reactii enzimatice extra si intracelulare, cu suferinta celulara, modificarea proprietatilor celulelor tumorale, scaderea viabilitatii prin sensibilizarea membranara la actiunea sistemelor enzimatice, scaderea ratei de adeziune postcrioconservare, pana la distructie celulara masiva prin liza osmotic, enzimatica, etc.

Prelucrarea fragmentelor se realizeaza in conditii de perfecta sterilitate, la hota de lucru.

Inainte de prelucrarea mecanica, fragmentele tumorale sunt spalate de 3 ori cu ser fiziologic sau PBS (solutie tampon fosfat – phosphate buffer solution), pentru indepartarea urmelor de sange si a detritusurilor celulare.



Fig. 7. Prelucrarea mecanica a fragmentului tumoral in hota de lucru

Prelucrarea si selectia grupurilor celulare elocvente se realizeaza cu instrumentar fin, extrem de ascutit, steril, de tip instrumentar microchirurgical, intr-o cutie Petri de dimensiuni medii. Este extrem de important recunoasterea macroscopica a partilor tumorale relevante, inlaturarea cu ajutorul lamei de bisturiu, a partilor necrozate, a portiunilor coagulate de catre chirurg, a vaselor de sange cerebrale sau a celor de neoformatie tumorala precum si a cheagurilor aferente, a zonelor fibroase de tip capsula tumorala, sau a portiunilor de glioza cerebrala, de creier normal peritumoral, a fragmentelor de tesut gras, muscular, etc. Partile de tesut tumoral relevante sunt de culoare brun-cenusiu-rosiatica, si recunoasterea lor este posibila numai prin experienta, in exereze tumorale multiple. Dupa eliminarea portiunilor tisulare irelevante ale fragmentului recoltat, fragmentele tumoral restante se sectioneaza in mod repetat cu bisturiul, pana la fragmente cu dimensiuni milimetrice.

Autorii au initiat o metodologie proprie de generare si mentinere a culturilor celulare primare derivate din tumori cerebrale pe baza protocoalelor existente in literatura de specialitate, modificate si adaptate in functie de rezultatele obtinute experimental (3).

Etapele initierii culturiilor primare de glioblastom au fost:

1. Dispersia enzimatica si mecanica a fragmentelor tisulare
2. Suspendarea in mediu de cultura DMEM cu 20% ser fetal
3. Subculturi seriate la confluenta 85-90%

Mediile utilizate: DMEM (Dulbecco Modified Essential Medium) + 3% Penicilina si Streptomicina + 20% ser fetal, Ser fetal , PBS (phosphate buffered saline solution - solutie salina tamponata)- 0,01M, Tripsina 1:250, glucoza 1%.

Dispersia tisulara s-a dovedit a fi mai eficienta si mai rapida cand s-a utilizat solutia de tripsina comparativ cu EDTA, in schimb, aderarea celulara si formarea monostratului s-au produs mult mai lent in cazul dispersiei enzimatice. In consecinta, dispersia fragmentelor prin utilizarea tripsinei asociata cu EDTA, desi este mai lenta, protejeaza celulele si favorizeaza aderarea si etalarea acestora. Timpul de dispersie se mentine la 2 – 3 minute; peste 5 – 8 minute este afectata integritatea membranei si / sau a receptorilor de membrana, iar celulele nu adera. EDTA in concentratie optima de 20mM actioneaza ca agent chelator de

Ca+2 (Ca+2 intervine in adeziunea intercelulara). Glucoza 1% in solutia de tripsina asigura un procent mai mare de celule viabile si o osmolaritate adecvata.
De asemenea, experimental s-a observat ca inactivarea tripsinei este mai eficienta daca se realizeaza prin adaugarea de ser fetal comparativ cu inactivarea pe gheata.
S-au cultivat culturile primare pentru 20 de pasaje, urmarindu-se aspectul fenotipic (Fig. 8).

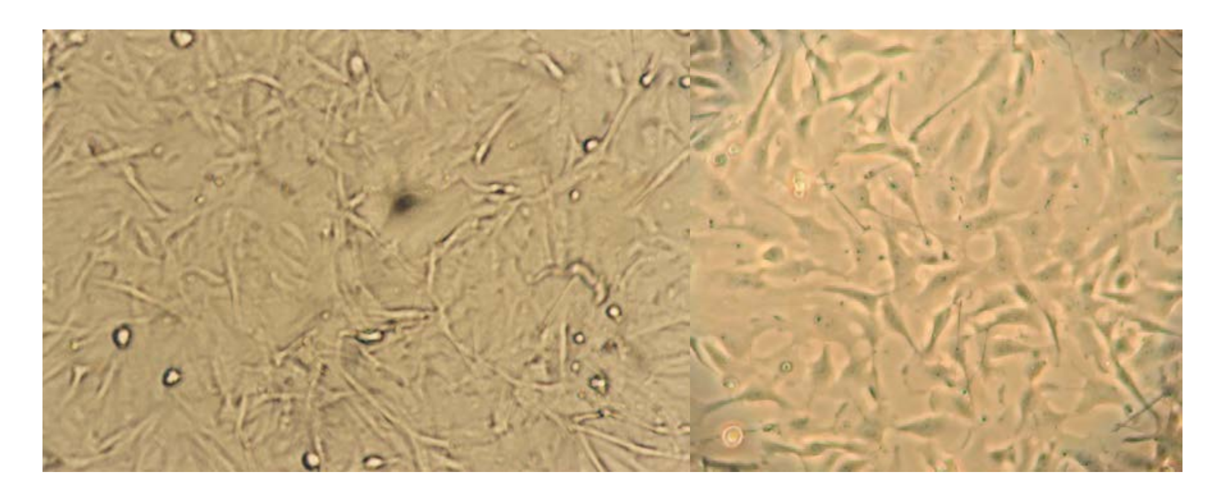


Fig. 8. Aspect microscopic (microscop Zeiss Axiovert 25C) al culturilor primare de glioblastom la pasajul 10 (a) respectiv 20 (b).

In cadrul proiectului a fost achizitionata linia de glioblastom U-251 MG (denumita initial U-373 MG) de la European Collection of Cell Cultures (ECACC). Aceasta este una dintre cele vechi si mai utilizate linii de glioblastom si este foarte utila in cadrul proiectului intrucat asigura o reproductibilitate inalta a experimentelor si a rezultatelor obtinute (4). Aceasta linie a fost livrata sub forma congelata in criotruburi. Pentru revitalizarea sa s-a utilizat protocolul uzual de revitalizare si s-au utilizat urmatorii reactivi: minimum essential medium (MEM), solutie aminoacizi non-essential, solutie piruvat, ser fetal, solutie antibiotic, solutie glutamina. Linia U251 se paseaza la o confluenta celulara de 60-70%. Aspectul fenotipic este ilustrat in Fig.9

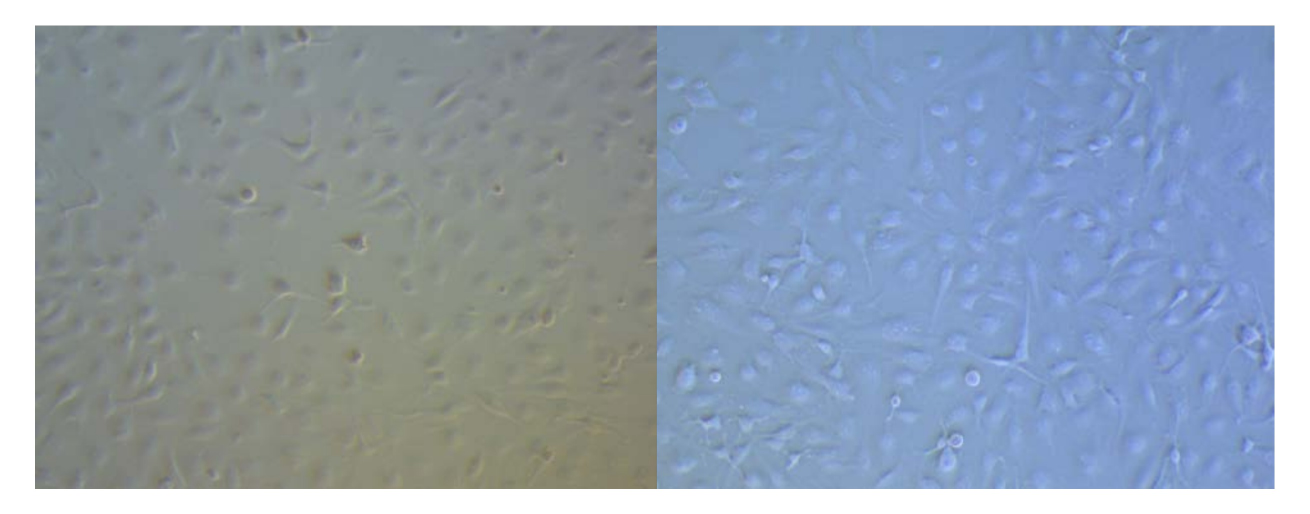


Fig.9. Aspectul liniei de glioblastom U251 in cultura.

C. Analiza qPCR a genelor implicate in invazia glioamelor

In cadrul proiectului a fost analizata expresia in tesutul tumoral a urmatoarelor gene: PAFAH1B1, NDEL1, CDK5, MYH9, TWIST1, SNAI2. Genele LIS1, NDEL1 si CDK5 (5,6,7,8). Ca expresie de referinta au fost folosite doua gene *house-keeping* Actina B (ACTB) si GAPDH.

Valoarea expresiei genelor urmarite in probele tumorale si peritumorale (normal) este ilustrata in tabelul 1

proba	nr. pac.	Assay	CDK5	MYH9	NDEL1	PAFAH1B1	SNAI2	TWIST1	ACTB vic	GAPDH vic
normal	1	1 (RQ)	0,9714	4,9686	1,867	2,251	1,2173	9,9229	1,4379	0,6955
normal	3	4 (RQ)	0,9471	1,9536	0,9278	1,5451	1,1274	0,1206	0,8542	1,1707
normal	4	6 (RQ)	1,2088	0,163	0,8194	1,5359	1,6445	0,351	1,2206	0,8193
normal	7	10 (RQ)	1	1	1	1	1	1	1	1
normal	8	12 (RQ)	0,6236	3,2145	3,475	3,0225	1,5478	0,3872	1,1074	0,903
normal	10	15 (RQ)	1,4261	2,0422	0,636	1,0868	2,5491	156,1858	0,9353	1,0692
normal	13	19 (RQ)	4,25	3,5051	2,1324	3,3684	0,7871	12,4159	0,9345	1,0701
normal	19	26 (RQ)	3,2193	3,1348	1,5566	1,8181	1,4803	1,7799	0,9797	1,0207
normal	20	28 (RQ)	0,822	1,983	1,0389	0,5797	1,3632	1061,1481	0,5873	1,7027
normal	21	30 (RQ)	0,8343	0,872	0,9905	1,2614	0,6833	1,0912	0,7298	1,3703
tumora	1	2 (RQ)	0,593	2,2895	0,3814	0,1078	2,8505	370,6255	0,4495	2,2246
tumora	3	5 (RQ)	1,3599	0,6167	0,3603	0,6792	1,3771	145,1248	0,6365	1,5711
tumora	4	7 (RQ)	2,2943	1,8173	0,9126	0,9301	3,2428	5,2325	1,1277	0,8868
tumora	7	11 (RQ)	1,9776	3,397	0,5937	0,5791	2,7548	0,067	0,5612	1,7819
tumora	8	13 (RQ)	1,6677	4,168	0,9616	0,8178	0,4639	24,3219	0,8966	1,1153
tumora	10	16 (RQ)	0,2629	3,7631	1,083	2,4531	6,457	246,7301	1,0814	0,9248
tumora	13	20 (RQ)	0,7655	1,022	0,9997	0,7724	1,3143	6,6413	1,1229	0,8905
tumora	19	27 (RQ)	1,2173	0,7826	0,4704	0,9973	3,3011	34,1066	0,4203	2,3793
tumora	20	29 (RQ)	0,9382	2,2798	1,0087	0,8262	1,5112	1107,3166	0,7897	1,2663
tumora	21	31 (RQ)	0,7491	3,8306	0,696	0,6982	2,5612	41,4521	0,8546	1,1701
tumora	9	14 (RQ)	0,8238	1,2496	1,0989	0,5959	3,0797	0,2886	0,573	1,7452
tumora	24	17 (RQ)	1,5311	0,7033	0,7352	0,566	3,5391	463,5058	0,509	1,9647
tumora	25	18 (RQ)	1,843	1,295	0,8638	0,8936	2,8642	14,3021	0,5292	1,8896
tumora	14	21 (RQ)	1,1479	1,3218	0,4402	0,7901		0,1735	0,5098	1,9617
tumora	15	22 (RQ)	0,6088	0,4047	0,4127	0,2448	2,6895	0,0735	0,4612	2,1683
tumora	16	23 (RQ)	1,7441	0,6171	0,7332	1,9885	3,5162	106,554	0,5555	1,8001
tumora	17	24 (RQ)	2,5625	0,7935	1,34	2,2342	0,7049	0,1133	0,4568	2,1894
tumora	18	25 (RQ)	1,6222	1,5868	0,8481	1,1109	0,8291	59,7247	0,6923	1,4444
tumora	2	3 (RQ)	1,8719	1,9149	1,0235	0,6593	0,5884	0,1668	0,6758	1,4797
tumora	5	8 (RQ)	4,0557	0,8265	4,1002	4,1463	7,2411	11,1016	3,1359	0,3189
tumora	6	9 (RQ)	0,1424	1,4381	0,5613	0,1722	1,2184	605,4901	0,5438	1,8388

Tabel 1. Expresia genelor urmarite in probele tumorale si peritumorale (normal) la pacientii luati in studiu

Bibliografie

1. Mark S. Greenberg, Handbook of Neurosurgery. Seventh edition. New York: Thieme Medical Publisher; 2010

2. Paul Kleihues, Webster Cavenee, Pathology and Genetics of Tumors of the Nervous System, World Health Organization (WHO) Classification of Tumors, Lyon: IARC Press; 2000

3. Paola Perego, Amerigo Boiardi, Nives Carenini, Michelandrea De Cesare, Ersilia Dolfini, Roberto Giardini, Ivana Magnani5, Stefania Martignone, Antonio Silvani, Carla Soranzo and Franco Zunino. Characterization of an established human, malignant, glioblastoma cell line (GBM) and its response to conventional drugs, Journal of Cancer Research and Clinical Oncology, 1994

4. Pontén, J., Macintyre, E. H. (1968) Long term culture of normal and neoplastic human glia. Acta Pathol Microbiol Scand A. 74, 465-486.

5. Beadle C, Assanah MC, Monzo P, Vallee R, Rosenfeld SS, and Canoll P. The Role of Myosin II in Glioma Invasion of the Brain. Molecular Biology of the Cell 2008; 19:3357–3368

6. Ivkovic S, Beadle C, Noticewala S, Massey SC, Swanson KR, Toro LN, Bresnick AR, Canoll P, and Rosenfeld SS. Direct Inhibition Of Myosin II Effectively Blocks Glioma Invasion In The Presence Of Multiple Motogen. Mol Biol Cell. 2012; 23(4):533-42

7. Elias MC, Tozer KR, Silber JR, Mikheeva S, Deng M, Morrison RS, Manning TC, Silbergeld DL, Glackin CA, Reh TA, Rostomily RC: TWIST is expressed in human gliomas and promotes invasion. Neoplasia 2005, 7:824-837

8. Svetlana A Mikheeva, Andrei M Mikheev, Audrey Petit, Richard Beyer, Robert G Oxford, Leila Khorasani, John-Patrick Maxwell, Carlotta A Glackin, Hiroaki Wakimoto, Inés González-Herrer, Isidro Sánchez-García, John R Silber, Robert C Rostomily, TWIST1 promotes invasion through mesenchymal change in human glioblastoma, Molecular Cancer 2010, 9:194

Data: 02.12.2013

Director proiect,

Dr Felix Mircea Brehar